

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

REGIANE STAFIM DA CUNHA

EFEITO DAS TOXINAS URÊMICAS *p*-CRESOL E *p*-CRESIL SULFATO NA
EXPRESSÃO DE OAT1 E OAT3 EM CÉLULAS MUSCULARES LISAS
VASCULARES DE COELHO (RASM)

CURITIBA

2014

REGIANE STAFIM DA CUNHA

EFEITO DAS TOXINAS URÊMICAS *p*-CRESOL E *p*-CRESIL SULFATO NA
EXPRESSÃO DE OAT1 E OAT3 EM CÉLULAS MUSCULARES LISAS
VASCULARES DE COELHO (RASM)

Monografia apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Andréa Emilia Marques Stinghen.

Co-orientadora: MSc. Rayana Ariane Pereira Maciel.

CURITIBA

2014

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Dorival e Regina, pela motivação, inspiração e suporte. Com certeza, o apoio e a intercessão de vocês foram essenciais para ser quem eu sou hoje.

À minha orientadora, Professora Andréa, por ter confiado em mim essa oportunidade de desenvolver esse trabalho e ter me orientado de forma primorosa, sempre disponível para discutir e enriquecer o trabalho com sua experiência e ensinamentos.

À minha co-orientadora Ray por ter me ajudado com sugestões e críticas construtivas.

Ao pessoal que fazem ou fizeram parte do Laboratório de Nefrologia Experimental, o LabNefro, pela amizade e cooperação. Giane, Paulo, Maíra, Bruna e Juliana: a ajuda de vocês foi importante para a conclusão deste trabalho. Um agradecimento especial à Alessandra pelo auxílio e dedicação.

À Professora Lia e à Professora Adriana pela correção do trabalho.

À Letícia, ao Dandie, ao Israel e à Liz por serem tão prestativos quando precisei de ajuda.

Aos mestres e colegas que promoveram meu crescimento científico e pessoal ao longo da minha formação. Em particular, aos meus amigos e amigas biozonáticos e os de coração por terem sido tão extraordinários. Juntos, compartilhamos inúmeros momentos de alegria e até alguns de desespero, ajudando uns aos outros nessa caminhada. Um especial agradecimento à Carol, à Marina e à Anne pela compreensão e amparo.

À Universidade Federal do Paraná e a todos que possibilitaram a realização deste trabalho.

Muito obrigada,

Regiane.

RESUMO

Pacientes com doença renal crônica (DRC) apresentam níveis elevados de toxinas urêmicas, tais como *p*-cresol (PC) e seu conjugado *p*-cresil sulfato (PCS), decorrente da disfunção renal e da dificuldade de eliminá-las através de terapias renais substitutivas. Dados da literatura demonstram que tais toxinas contribuem significativamente para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, como a aterosclerose, via ativação de resposta inflamatória e estresse oxidativo. Em nível molecular, a entrada do PC e do PCS na célula é mediada pelas proteínas transportadoras OAT1 e OAT3 da família dos transportadores de ânions orgânicos (OAT). Portanto, o presente trabalho visa analisar os efeitos causados por PC e PCS em células vasculares de músculo liso de coelho (RASM, do inglês *Rabbit Aortic Smooth Muscular*) e avaliar a expressão de OAT1 e OAT3. PC e PCS foram preparados e utilizados no tratamento das células de acordo com o Eutox nas concentrações normal (0,6 e 0,08 mg/L), urêmica (20,1 e 1,75 mg/L) e máxima urêmica (40,7 e 2,6 mg/L). A viabilidade celular foi analisada pelo ensaio de MTT, com ou sem probenecid (Pb) a 2,5 mM. A expressão de OAT1 e OAT3 foi investigada através da imunocitoquímica e do Dot-blot. Os dados foram analisados pelos testes t e Mann-Whitney de acordo com sua distribuição e resultados. O PC diminuiu significativamente a viabilidade celular nas concentrações urêmica e máxima urêmica ($P<0,05$ e $P<0,0001$, respectivamente). O mesmo aconteceu com PCS, mas em todas as concentrações testadas ($P<0,0001$). Quando as células foram tratadas com Pb, houve um aumento significativo na viabilidade celular ($P<0,0001$). A imunocitoquímica demonstrou visualmente uma marcação positiva para OAT1, o que não aconteceu para OAT3, confirmado pelo dot-blot com o tratamento com PC na concentração máxima urêmica ($P<0,01$) quando comparado com o controle. Em conclusão, o presente estudo demonstrou que tanto o PC como o PCS têm efeito citotóxico em células RASM que afetam a viabilidade das células, que foi restaurado após o tratamento com Pb, um inibidor de OAT. PCS parece ser mais prejudicial, uma vez que leva ao aumento da expressão de OAT1.

Palavras-chave: toxicidade urêmica, *p*-cresol, *p*-cresil sulfato, OATs, RASM.

ABSTRACT

Patients with chronic kidney disease (CKD) have high levels of uremic toxins, such as *p*-cresol (PC) and its conjugate *p*-cresyl sulfate (PCS), as a result of renal dysfunction and difficulty of eliminate them through the renal replacement therapies. Literature data show that these toxins contribute significantly to the development of cardiovascular diseases such as atherosclerosis, via activation of inflammatory response and oxidative stress. At the molecular level, the PC and the PCS input in the cell is mediated by the organic anion transporters (OAT) proteins OAT1 and OAT3. Therefore, this study aims to analyze PC and PCS effects caused in rabbit aortic vascular smooth muscle cells (RASM) and evaluate OAT1 and OAT3 expression. PC and PCS were prepared and used in cells treatment according to Eutox in their normal (0.6 and 0.08 mg/L), uremic (20.1 and 1.75 mg/L) and maximum uremic (40.7 and 2.6 mg/L) concentrations. Cell viability was analyzed by MTT assay, with or without probenidic (Pb) at 2.5 mM. OAT 1 and OAT3 expression was investigated by immunocytochemistry and dot-blot assays. Data were analyzed by t test and Mann-Whitney test used according with their distribution and results. PC decreased significantly the cell viability at uremic and maximum uremic concentrations ($P<0.05$ and $P<0.0001$, respectively). The same happened with PCS but in all concentrations tested ($P<0.0001$). When the cells were treated with Pb there was a significantly increased in cell viability ($P<0.0001$). Immunocytochemistry assay demonstrated visually a positive stain for OAT1, which did not occur for OAT3, confirmed by dot-blot assay after treatment with PC at maximum uremic concentration ($P<0.01$) when compared to control. In concluding, the present study demonstrated that both PC and PCS have cytotoxic effect on RASM cells affecting cells viability, which was restored after Pb treatment, an OAT analog. PCS seems to be more deleterious, once it leads to increased expression of OAT1.

Key-words: uremic toxicity, *p*-cresol, *p*-cresyl sulfate, OATs, RASM.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Formação do <i>p</i> -cresol	16
Figura 2 – Formação do <i>p</i> -cresil sulfato	17
Figura 3 – Modelo do transportador de ânions orgânicos (OAT).....	19
Figura 4 – Avaliação da viabilidade das células RASM após exposição ao PC	28
Figura 5 – Avaliação da viabilidade das células RASM após exposição ao PCS.....	29
Figura 6 – Efeito do PC e do PCS na coloração por imunocitoquímica para OAT1 ..	30
Figura 7 – Efeito do PC e do PCS na coloração por imunocitoquímica para OAT3..	31
Figura 8 – Expressão de OAT1 em células RASM.....	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Estadiamento da doença renal crônica (DRC)	12
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DAB	–	Diaminobanzidina
DRC	–	Doença renal crônica
DCV	–	Doenças cardiovasculares
EPM	–	Erro padrão médio
HNF	–	<i>Hepatocyte nuclear factor</i>
ICAM-1	–	<i>Intercellular adhesion molecule-1</i>
IL-8	–	Interleucina-8
MCP-1	–	<i>Monocyte chemoattractant protein-1</i>
MTT	–	Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
OAT	–	<i>Organic anion transporter</i>
Pb	–	<i>Probenecid</i>
PBS	–	Tampão fosfato salino
PC	–	<i>p</i> -cresol
PCG	–	<i>p</i> -cresil glucoronidato
PCS	–	<i>p</i> -cresil sulfato
RASM	–	<i>Rabbit Aortic Smooth Muscle Cells</i>
TFG	–	Taxa de filtração glomerular
VCAM-1	–	<i>Vascular cell adhesion molecule-1</i>
VSMC	–	<i>Vascular smooth muscle cell</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
2.1 DOENÇA RENAL CRÔNICA (DRC)	12
2.2 TOXINAS URÊMICAS.....	14
2.2.1 <i>p</i> -Cresol (PC)	15
2.2.2 <i>p</i> -Cresil sulfato (PCS).....	17
2.3 TRANSPORTADORES DE ÂNIONS ORGÂNICOS (OATs)	18
2.4 UREMIA, INFLAMAÇÃO E ATHEROSCLEROSE	21
3 OBJETIVOS.....	23
3.1 OBJETIVO GERAL	23
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
4 MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1 CULTURA CELULAR	24
4.2 TRATAMENTO DAS CÉLULAS	24
4.3 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR (MTT).....	25
4.4 IMUNOCITOQUÍMICA PARA DETECÇÃO DO OAT1 E OAT3.....	25
4.5 ANÁLISE DE OAT1 POR <i>DOT-BLOT</i>	26
4.5.1 Extrato celular	26
4.5.2 <i>Dot-blot</i>	27
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	27
5 RESULTADOS.....	28
5.1 VIABILIDADE CELULAR.....	28
5.2 DETECÇÃO DE OAT1 E OAT3	29

5.3 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE OAT1	32
6 DISCUSSÃO	33
7 CONCLUSÃO	36
8 ENSAIOS FUTUROS	37
REFERÊNCIAS.....	38

1 INTRODUÇÃO

Os rins desempenham um papel fisiológico fundamental para a vida. Eles realizam tanto funções excretórias como regulatórias e endócrinas que contribuem diretamente para a manutenção da homeostase. Dentre elas, pode-se citar a excreção de compostos urêmicos por meio da urina, a regulação da osmolaridade e do volume sanguíneo e a secreção de hormônios, como a renina e a eritropoietina. No entanto, essas funções podem ser comprometidas com o acometimento de doenças renais (GUYTON; HALL, 2011).

A doença renal crônica (DRC), particularmente, ganha cada vez mais notoriedade ao acometer e impactar negativamente um número expressivo da população humana. Ela é uma doença renal que se distingue pela perda lenta e gradativa da função renal de forma irreversível. Com isso, a excreção de numerosos compostos químicos se torna prejudicada, inclusive aqueles que apresentam toxicidade. O acúmulo desses compostos no organismo é denominado uremia, estado clínico que propicia diversas complicações ao estado de saúde do indivíduo (BARRETO *et al.*, 2014).

Um dos efeitos nocivos da uremia é a produção de resposta inflamatória, dado que as toxinas urêmicas acabam sendo reconhecidas pelo organismo como uma forma de agressão aos tecidos e células. Dessa maneira, elas ocasionam a aceleração do desenvolvimento de doenças cardiovasculares (DCV), como a aterosclerose, uma doença intrinsecamente relacionada com o sistema imune. Nesse caso especificamente, a expressão de moléculas inflamatórias promove o recrutamento de monócitos pelas células endoteliais, seguida pela migração e ativação de macrófagos na camada íntima do vaso, levando a formação da placa aterosclerótica (LI; GLASS, 2002). Sob esse prisma, estudos desenvolvidos por nosso grupo demonstram o aumento da expressão de marcadores plasmáticos de ativação endotelial, tais como *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1) e *vascular adhesion molecule-1* (VCAM-1), com a exposição às toxinas urêmicas em concentrações superiores ao normal (STINGHEN *et al.*, 2009, 2010).

As toxinas urêmicas, por sua vez, nem sempre são possíveis de serem removidas de forma eficiente em terapias substitutivas da função renal, tais como a hemodiálise e a diálise peritoneal. É o caso do *p*-cresol e do seu conjugado, o *p*-cresil sulfato, ambos derivados da metabolização dos aminoácidos tirosina e fenilalanina pela microbiota intestinal. Uma vez absorvidos, eles se ligam a proteínas, fato que dificulta a remoção por filtração. A captação dessas toxinas da circulação pelas células é associada aos transportadores de ânions orgânicos (OATs) 1 e 3. Em razão disso, os OATs podem estar correlacionados com a toxicidade do *p*-cresol e do *p*-cresil sulfato em nível celular (WATANABE; SAKAGUCHI; *et al.*, 2013).

Considerando a possibilidade de captação das toxinas urêmicas pelas células vasculares de músculo liso através dos OATs, cuja resposta pode contribuir para o desenvolvimento de aterosclerose, o presente trabalho tem como escopo analisar a expressão dos transportadores OAT1 e OAT3 visando compreender os mecanismos celulares e moleculares envolvidos no processo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 DOENÇA RENAL CRÔNICA (DRC)

A DRC é caracterizada pela perda lenta, progressiva e definitiva da capacidade funcional dos rins. Consequentemente, diversos compostos urêmicos que deveriam ser excretados acabam se acumulando no organismo, estado conhecido como uremia. Isso ocasiona diversas complicações clínicas que podem levar o paciente à morte (BARRETO *et al.*, 2014; ROSSI *et al.*, 2014).

A *National Kidney Foundation* (NKF), em seu documento *Kidney Disease Outcomes Quality Initiative* publicado em 2002, define a DRC de acordo com os seguintes critérios: presença de lesão renal por tempo igual ou superior a três meses, acompanhada por anormalidades estruturais ou funcionais dos rins, com ou sem redução na taxa de filtração glomerular (TFG). Considerando este último aspecto, é possível categorizar os diferentes momentos da progressão da DRC em cinco estágios, apresentados na tabela 1. Além da TFG, a albuminúria também pode ser utilizada como marcador do dano renal (NKF, 2002).

Tabela 1 – Estadiamento da doença renal crônica (DRC)

Estágio	Descrição	Taxa de filtração glomerular (TFG) (mL/min/1,73 m ²)
1	Lesão renal com TFG normal ou aumentada	≥90
2	Lesão renal com leve diminuição da TFG	60–89
3	Lesão renal com moderada diminuição da TFG	30–59
4	Lesão renal com severa diminuição da TFG	15–29
5	Falência renal ou em terapia substitutiva	<15

Fonte: NKF (2002).

A estimativa da prevalência da DRC varia entre 8 e 16% da população mundial e, nas últimas décadas, esse número só tem aumentado (JHA *et al.*, 2013). Lozano *et al.* (2012) constataram ao analisar o documento *Global Burden of Disease*, elaborado pela Organização Mundial da Saúde, que a DRC subiu da vigésima sétima posição em 1990 para a décima oitava posição no ano de 2010 no ranking das causas de morte a nível global. Estima-se que a DRC, em conjunto com outras doenças crônicas, corresponde a 25 milhões de mortes por ano no mundo, encontrando-se em fase de crescimento exponencial (EL NAHAS, 2010). Só no Brasil, o número de pessoas em tratamento dialítico, ou seja, em fase de falência renal, dobrou entre os anos de 2000 e 2008, chegando a aproximadamente 90 mil pacientes (SESSO *et al.*, 2010). Recentemente, dados do censo nacional da Sociedade Brasileira de Nefrologia apontam uma estimativa de 100 mil pacientes em tratamento dialítico no ano de 2013 (CENSO SBN, 2013).

Certos grupos de riscos possuem maior propensão para desenvolver a DRC, principalmente entre diabéticos e hipertensos. Doenças que afetam os rins, como a glomerulonefrite, e o consumo de substâncias ou medicamentos nefrotóxicos também podem ser possíveis causas para a DRC (EVANS; TAAL, 2011; JHA *et al.*, 2013). No Brasil, a nefropatia hipertensiva seguida da diabetes são as principais doenças de base em pacientes dialíticos (SESSO *et al.*, 2014). Além disso, existem fatores genéticos que podem levar a DRC. Estudos apontam que determinadas variações no gene APOL1 aumentam significativamente o risco de doenças renais em americanos de descendência africana (GENOVESE *et al.*, 2010; KANJI *et al.*, 2011). Todavia, algumas causas ainda são desconhecidas.

O diagnóstico precoce e o tratamento adequado podem retardar a progressão da doença. Contudo, o fato da DRC ser assintomática leva muitos pacientes a serem diagnosticados apenas nos estágios avançados da doença. Quando isso é feito, o tratamento empregado consiste em ações para preservar a função renal, como o controle da pressão arterial e da proteinúria (BASTOS; KIRSZTAJN, 2011). Já as terapias substitutivas da função renal, tais como a diálise peritoneal e a hemodiálise, são aplicadas em pacientes nos estágios mais avançados da DRC, quando a TFG é menor que 15 mL/minutos/1,73 m². Essas terapias possuem a finalidade de realizar a filtração dos fluidos corporais e, assim, remover os resíduos e toxinas possíveis. Entretanto, sua eficácia é limitada uma vez

que elas corrigem apenas parcialmente a toxicidade urêmica (STINGHEN *et al.*, 2010).

O mau funcionamento dos rins com o consequente acúmulo de toxinas urêmicas perturba diversos sistemas no organismo, resultando em múltiplas complicações clínicas. Dentre elas, pode-se citar a anemia, a acidose metabólica, a alteração do metabolismo mineral, a dislipidemia, o hiperparatireoidismo, a resistência insulínica, a desnutrição, a inflamação, as desordens de coagulação, as atrofia dérmicas, a polineurite, a pericardite, a falência cardíaca, a hipertensão e o desenvolvimento de DCV. Com esse quadro clínico, o paciente pode chegar ao óbito. Diante disso, as DCV configuram a principal causa de morte em pacientes com DRC (GO *et al.*, 2004; VANHOLDER *et al.*, 2005, 2008).

Sob esse prisma, a condição clínica dos doentes renais crônicos se encontra vulnerável, especialmente o sistema cardiovascular. Sobre isso, estudos indicam que a uremia está associada à produção de resposta inflamatória que acaba acelerando o desenvolvimento de DCV, tais como a aterosclerose e a miocardiopatia (STINGHEN *et al.*, 2010). Não obstante, além da uremia outros fatores também podem contribuir para estimular a resposta do sistema imune no doente renal crônico. Dentre eles, cita-se a alteração da permeabilidade da barreira intestinal que resulta na passagem de endotoxinas para a circulação, as infecções provenientes do acesso da diálise (seja pelo sangue, seja pelo peritônio), o procedimento dialítico, as medicações, as comorbidades e a perda energético-proteica, o PEW (KATO *et al.*, 2008; HAUSER *et al.*, 2010; VAZIRI *et al.*, 2012).

2.2 TOXINAS URÊMICAS

As toxinas urêmicas são, por definição, substâncias excretadas pelos rins e eliminadas por meio da urina em condições saudáveis, mas que, contudo, ficam retidas no organismo em razão de uma disfunção renal. Sob essa perspectiva, mais de uma centena de compostos já foram identificadas como toxinas urêmicas. Dentre

eles, encontramos uma diversidade de substâncias, desde compostos orgânicos até peptídeos (EuTox, <http://eutoxdb.odeesoft.com/index.php>; COHEN *et al.*, 2007).

Considerando as propriedades físico-químicas das toxinas urêmicas e a sua capacidade de ser removida pela diálise, é possível classificá-las em três grandes grupos de compostos urêmicos. O primeiro grupo corresponde aos compostos que são solúveis, com até 500 Daltons de peso molecular e de fácil remoção pela diálise, tais como a ureia, o ácido úrico e a creatinina. Já o segundo grupo abrange os compostos maiores, com peso molecular acima de 500 Daltons, exemplificado pela β 2-microglobulina e pela leptina. Nesse caso, é requerida uma diálise especial contendo poros suficientemente grandes para permitir a transposição dessas moléculas. Por fim, o terceiro grupo compreende os compostos geralmente com baixo peso molecular e alta afinidade a proteínas, pelas quais se encontram ligadas dificultando a sua remoção pela diálise. Como exemplo desse grupo, temos os fenóis e os indóis (VANHOLDER *et al.*, 2003, 2008, 2011).

Na DRC, inúmeras toxinas urêmicas contribuem para a uremia, das quais se destacam neste trabalho o *p*-cresol e o seu conjugado, o *p*-cresil sulfato.

2.2.1 *p*-Cresol (PC)

O *p*-cresol (PC) ou 4-metilfenol, de fórmula química C_7H_8O , é um composto orgânico fenólico de baixo peso molecular, com 108,1 Daltons. Ele faz parte do grupo dos compostos urêmicos ligados à proteína (VANHOLDER *et al.*, 1999, 2011).

O PC é um dos produtos do metabolismo dos aminoácidos tirosina e fenilalanina (Figura 1). Esses aminoácidos são metabolizados por bactérias da microbiota intestinal, tais como enterobactérias e a *Clostridium perfringens*, por processo de fermentação. A bactéria anaeróbica e patogênica *Clostridium difficile* é capaz de converter o ácido 4-hidroxifenilacético para PC com a enzima *p*-hidroxifenil acetato descarboxilase (pHPA). Uma vez formados, os compostos fenólicos acabam sendo absorvidos no intestino (VANHOLDER *et al.*, 1999; SELMER; ANDREI, 2001; MEIJERS; EVENEPOEL, 2011).

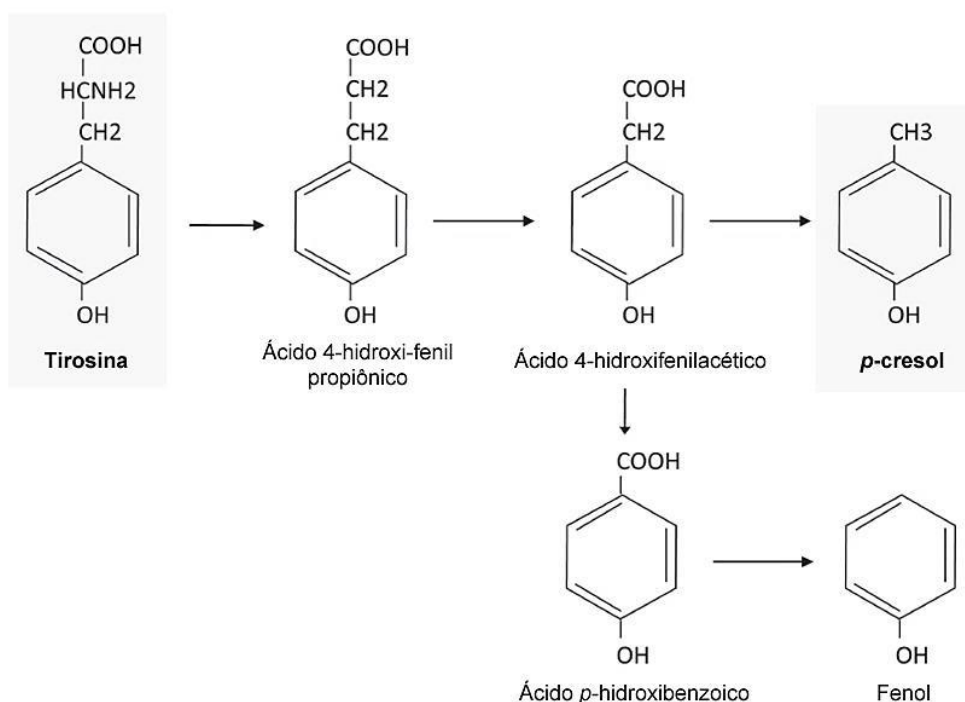


Figura 1 – Formação do *p*-cresol

Fonte: Adaptado de Vanholder *et al.* (2011).

Na própria mucosa intestinal e no fígado, o PC é metabolizado pelo processo de conjugação por sulfatação ou por glucuronidação formando, respectivamente, PCS ou *p*-cresil glucoronidato (PCG). Entretanto, os níveis de PCS são preponderantes em comparação ao de PCG. Não só isso, estudos recentes mostram que, devido à rápida metabolização do PC, a concentração do PCS também é superior diante a do seu precursor (LOOR *et al.*, 2005; VANHOLDER *et al.*, 2011; LIABEUF *et al.*, 2013; BARRETO *et al.*, 2014).

Outra fonte para a síntese de PC é através da oxidação do tolueno. Bactérias presentes no ambiente como as *Pseudomonas stutzeri* e as *Pseudomonas mendocina* produzem a enzima tolueno 4-monooxigenase que converte o tolueno para PC (WHITED; GIBSON, 1991; CAFARO *et al.*, 2005). Dessa forma, é possível ocorrer contaminação por inalação, ingestão ou contato com a pele diante da exposição ambiental ao tolueno e, conseqüentemente, ao PC. Contudo, a disponibilidade de tirosina é significativamente maior do que o tolueno como substrato para a síntese de PC (PERSICO; NAPOLIONI, 2012).

2.2.2 *p*-Cresil sulfato (PCS)

O *p*-cresil sulfato (PCS) é proveniente da sulfatação de PC, no qual é adicionado ânion sulfato à hidroxila do seu precursor (Figura 2). Com fórmula química $C_7H_8O_4S$, o PCS é um composto orgânico que apresenta peso molecular de 188,2 Daltons, com alta afinidade por proteínas. De fato, o PCS se liga de forma não-covalente com a albumina, competindo pelo mesmo sítio de ligação — o Sudlow II — de outra toxina urêmica, o indoxil sulfato (MEIJERS *et al.*, 2008; MEIJERS; EVENEPOEL, 2011).

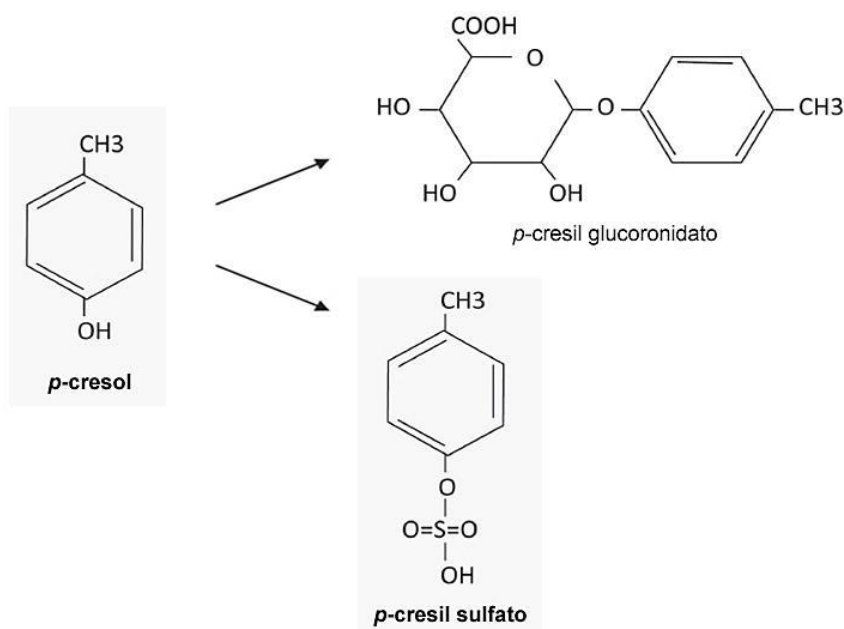


Figura 2 – Formação do *p*-cresil sulfato

Fonte: Adaptado de Vanholder *et al.* (2011).

A fração total máxima de PCS encontrada num paciente com uremia é de 105 mg/L, com média equivalente a 43 mg/L. Já a média da fração livre de PCS é igual a 2,6 mg/L. Comparativamente, indivíduos normais possuem fração total de PCS de 1,9 mg/L enquanto a livre é 0,08 mg/L (VANHOLDER *et al.*, 2011, 2014; DURANTON *et al.*, 2012). Em doentes renais crônicos, Wu *et al.* (2011) verificaram uma correlação ($r = 0,64$ e $P < 0,001$) entre os valores séricos totais de PCS (em log)

e os valores estimados da TFG (em $-\log$), indicando uma possível previsão do risco de progressão renal em pacientes com diferentes estágios de DRC.

Em razão da predominância dos níveis de PCS em relação ao seu precursor e também de PCG, considera-se o PCS como o principal responsável pelo efeito biológico em condições urêmicas dentre os três compostos (VANHOLDER *et al.*, 2011). Diante disso, o PCS tem sido associado à disfunção endotelial, pois na sua presença células extraídas de cordão umbilical em cultivo acabam liberando mais micropartículas do que em condições normais (MEIJERS *et al.*, 2009). Outro efeito da exposição ao PCS é o aumento de apoptose e o decréscimo na proliferação de osteoblastos, células responsáveis pela síntese da matriz extracelular do tecido ósseo (TANAKA *et al.*, 2013).

A excreção renal tanto de PC como de PCS dependem de transportadores de ânions orgânicos, os OATs, particularmente das isoformas OAT1 e OAT3 expressas nas células do túbulo renal, dado que há uma limitação pela filtração glomerular por causa da ligação das toxinas com as proteínas (MIYAMOTO *et al.*, 2011; POESEN *et al.*, 2013). No entanto, verifica-se a expressão de OATs não apenas nos rins, mas também em outros tecidos e órgãos (VANWERT *et al.*, 2010; BURCKHARDT, 2012).

2.3 TRANSPORTADORES DE ÂNIONS ORGÂNICOS (OATs)

Os transportadores de ânions orgânicos (OATs, do inglês *Organic Anion Transporter*) são proteínas transmembrânicas que realizam o transporte mediado de ânions orgânicos hidrofílicos de baixo peso molecular. Através deles ocorre a eliminação de uma variedade de substâncias endógenas, xenobióticos e metabólitos do organismo, inclusive toxinas urêmicas. Até mesmo certas drogas utilizadas em tratamentos farmacológicos são capazes de interagir com os OATs, tais como os antibióticos β -lactâmicos e a probenecida (WOLMAN *et al.*, 2013). O ácido *p*-aminohipurato é um exemplo de substrato dos OATs que também é aplicado para

medir o fluxo plasmático renal por meio de depuração (ULLRICH, 1997; ANZAI *et al.*, 2006).

Os OATs pertencem à família de genes carreadores de solutos (SLC), especificamente a SLC22A. Atualmente, já foram identificados pelo menos dez isoformas do tipo OAT1–10. Todas elas têm em comum 12 domínios transmembrânicos, com múltiplas glicosilações na alça extracelular entre os domínios 1 e 2 e terminações NH₂ e COOH no meio citoplasmático (Figura 3). Os OAT1–10 conjuntamente com o URAT1 compõem a família proteica dos OATs. (BURCKHARDT; WOLFF, 2000; SAITO, 2010; BURCKHARDT, 2012).

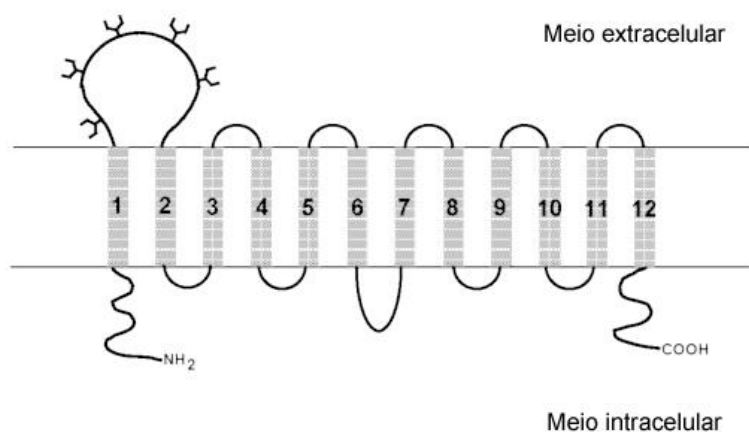


Figura 3 – Modelo do transportador de ânions orgânicos (OAT)

Fonte: Tanaka *et al.* (2004)

Dentro da família dos OATs, o OAT1 (gene SLC22A6) e o OAT3 (gene SLC22A8) são capazes de realizar a captação dos ânions orgânicos presentes na corrente sanguínea, cujo transporte é caracterizado por operar como antiporte ao trocar o α -cetoglutarato intracelular por ânions orgânicos extracelulares. Na excreção renal, essa captação ocorre na membrana basolateral das células renais. Em seguida, os ânions orgânicos são removidos, por transporte transcelular unidirecional, para o líquido tubular através da membrana luminal (ANZAI *et al.*, 2006; BURCKHARDT, 2012).

Tanto o OAT1 como o OAT3 possuem expressão variada nos diferentes tecidos do organismo, sendo ambos mais expressos nos rins. Desse modo, o OAT1

já foi encontrado em menores proporções no cérebro, no plexo coróide e no corpo da íris-ciliar. Já o OAT3 também pode ser verificado expresso no cérebro e no plexo coróide, além de estar presente nos olhos e na glândula adrenal (PRITCHARD *et al.*, 1999; ALEBOUYEH *et al.*, 2003; NISHIMURA; NAITO, 2005; ASIF *et al.*, 2005; ZHANG *et al.*, 2008; KOEPESELL, 2013). No vaso especificamente, as células de músculo liso de ratos expressam OAT3 (YAMAMOTO *et al.*, 2006). Ambos os transportadores já foram clonados e caracterizados nos homens, macacos, porcos, coelhos, ratos e camundongos (BURCKHARDT, 2012).

Fatores genéticos podem interferir na transcrição dos genes dos OATs e, dessa maneira, afetar a sua expressão nos diferentes tecidos. O *hepatocyte nuclear factor-1* (HNF-1) é apontado como um importante regulador da transcrição dos genes de transportadores. Isso pode ser evidenciado pela redução significativa na expressão de OAT1 nos rins em camundongos que não possuem HNF-1 α funcional (MAHER *et al.*, 2006).

Outro fator que também pode alterar a transcrição de OATs são os eventos epigenéticos através da metilação do DNA. Desse modo, os genes do OAT1 e do OAT3 se encontram hipermetilados no tecido hepático ao passo que estão hipometilados no tecido renal tanto em humanos como em ratos (JIN *et al.*, 2012). Nesse contexto, Kikuchi *et al.* (2006) verificaram que a expressão de OAT3 humano é regulada positivamente pelo HNF-1 α e HNF-1 β enquanto é regulada negativamente pela metilação do DNA.

Interações do tipo proteína-proteína também podem afetar a atividade dos OATs. É o caso da proteína quinase C que na forma ativa é capaz de inibir os transportadores ao se ligar aos seus sítios intracelulares (LU *et al.*, 1999; WOLFF *et al.*, 2003). Em contrapartida, a isoforma da proteína quinase C ζ é capaz de aumentar a atividade do OAT1 e do OAT3 (BARROS *et al.*, 2009).

Existem estudos que apontam para alterações na expressão dos OATs em razão do estado patofisiológico (ANZAI *et al.*, 2006). Por exemplo, há um acréscimo da expressão de OAT1 e OAT3 em células dos túbulos proximais dos rins em ratos com calcificação vascular (BULACIO *et al.*, 2012). Da mesma forma, foi demonstrado que a administração da toxina urêmica indoxil sulfato em ratos nefrectomizados eleva a expressão dos OATs nos túbulos renais, transportadores da toxina aplicada (ENOMOTO *et al.*, 2002). Já no caso de carcinoma renal em

humanos, encontra-se no rim mais OAT3 do que OAT1 (MOTOHASHI *et al.*, 2002). Em outra situação, o nível proteico de OAT1 expresso nos rins reduziu significativamente em ratos 5/6 nefrectomizados após seis meses da cirurgia (TORRES *et al.*, 2005). Em condições urêmicas, a captação de PCS por células via OAT1 e OAT3 foi confirmada por meio da cromatografia líquida de alta eficiência, o HPLC (WATANABE; SAKAGUCHI; *et al.*, 2013).

2.4 UREMIA, INFLAMAÇÃO E ATEROSCLEROSE

Em nível celular, as toxinas urêmicas captadas pelas células endoteliais são capazes de promover a sua disfunção. Com isso, a inflamação pode se instaurar na parede do vaso, contribuindo para a calcificação vascular e exercendo um papel crucial no desenvolvimento da aterosclerose, DCV pelo qual pode ocorrer a obstrução dos vasos e, conseqüentemente, levar a morte (STINGHEN; PECOITS-FILHO, 2011; LIU *et al.*, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2013).

Primeiramente, no processo aterogênico, as selectinas das células endoteliais interagem com os monócitos presentes na corrente sanguínea, desacelerando-os, processo conhecido como rolamento. Outras moléculas de adesão reforçam a interação entre as células, como a *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1) e a *intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1). De forma consecutiva, a firme adesão é mediada pela interleucina-8 (IL-8) e pelo *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1). Uma vez aderidos, os monócitos migram para a camada íntima vascular onde se diferenciam em macrófagos. Nessa forma, eles realizam a fagocitose das lipoproteínas de baixa densidade oxidadas, transformando-se em células espumosas, ricas em lipídeos. Do mesmo modo, as células do músculo liso da camada média do vaso podem sofrer migração patogênica para a camada íntima, colaborando com a formação da cápsula fibrosa e com a estabilidade da placa aterosclerótica. Concomitantemente, estas células possuem plasticidade fenotípica e são capazes de secretar citocinas e moléculas de adesão, contribuindo com a resposta inflamatória (LI; GLASS, 2002; DORAN *et al.*, 2008).

Estudos *in vivo* e *in vitro* mostram que a uremia é capaz de induzir a expressão de diversas moléculas inflamatórias de modo a colaborar com a formação da placa aterosclerótica. O nosso grupo já demonstrou o aumento na expressão de MCP-1 e VCAM-1 no plasma de doentes renais crônicos em estágios mais avançados. E ainda foi constatado o acréscimo na expressão dessas mesmas moléculas juntamente com a IL-8 ao exporem células endoteliais, extraídas do cordão umbilical humano, ao plasma urêmico de acordo com uma escala temporal de 0 a 6 horas (STINGHEN *et al.*, 2009).

Já com a utilização de modelos animais, demonstrou-se que ratos com uremia induzida possuem propensão para formação de placas ateroscleróticas, precedida pela maior expressão das moléculas ICAM-1 e VCAM-1 (BRO *et al.*, 2004). Coelhos com uremia induzida por nefrectomia também tendem a acelerar o desenvolvimento de aterosclerose, porém a presença do inibidor do proteassoma tem um efeito negativo sobre esse processo (FENG *et al.*, 2010).

Além das células endoteliais do vaso, encontram-se na sequência as células vasculares de músculo liso (VSMC) que também são afetadas pela toxicidade urêmica. Assim sendo, a exposição de VSMCs humano ao soro urêmico induz ao estado trombogênico mediado em grande parte pela regulação da expressão e atividade do fator tecidual (CHITALIA *et al.*, 2013). O composto urêmico leptina, especificamente, promove a proliferação, a migração e a calcificação de VSMCs (ODA *et al.*, 2001). A proliferação dessas mesmas células já foi verificada ao submetê-las a tratamentos com a toxina urêmica indoxil sulfato (YAMAMOTO *et al.*, 2006). Dessa forma, na circulação se encontram diversas toxinas urêmicas e, cada uma delas, pode provocar efeitos adversos nos tecidos (BARRETO *et al.*, 2014).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a expressão dos transportadores de ânions OAT1 e OAT3 em células musculares lisas vasculares de coelho (linhagem RASM) após exposição às toxinas urêmicas PC e PCS.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Analisar a viabilidade celular em RASM após 24 horas de exposição ao PC e PCS;
- ✓ Avaliar a expressão de OAT1 e OAT3 em RASM através da técnica de imunocitoquímica após tratamento com PC e PCS.
- ✓ Investigar a expressão de OAT1 em RASM por meio de *Dot-blot* após tratamento com PC e PCS.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CULTURA CELULAR

As células RASM (do inglês *Rabbit Aortic Smooth Muscular*) são provenientes de uma linhagem celular de músculo liso da aorta de coelho estabelecida e imortalizada por seleção pelo Professor Vincenzo Buonassisi da Universidade de São Paulo, Escola Paulista de Medicina (BUONASSISI; VENTER, 1976), cedidas gentilmente pela Professora Doutora Lia Sumie Nakao.

O cultivo das células RASM consistiu em semeá-las em frascos de cultivo contendo meio F-12 (Gibco, Grand Island, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco, Grand Island, EUA) e 1% da solução de penicilina (10000 IU/mL) e estreptomicina (10 mg/mL) (Gibco, Grand Island, EUA). Os frascos foram mantidos em incubadora a 37°C e 5% de CO₂.

4.2 TRATAMENTO DAS CÉLULAS

O presente estudo utilizou as concentrações totais de PC (Sigma, St. Louis, EUA) e as concentrações da fração livre de PCS recomendadas pelo *European Uremic Toxin Work Group* (EuTox, <http://eutoxdb.odeesoft.com/index.php>). Dessa forma, cada toxina foi avaliada em três concentrações: a normal (PCn = 0,6 mg/L e PCSn = 0,08 mg/L), a urêmica (PCu = 20,1 mg/L e PCSu = 1,75 mg/L) e a máxima urêmica (PCm = 40,7 mg/L e PCSm = 2,6 mg/L).

4.3 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR (MTT)

O MTT, ou brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio, foi utilizado para determinar a viabilidade celular via ensaio colorimétrico, conforme Mosmann (1983). Para isso, as células RASM foram plaqueadas em placa de cultivo de 96 poços a uma densidade de 10^4 células por poço. Após 18 horas de incubação, substituiu-se o meio pelos tratamentos com PC e PCS, com ou sem *probenecid* (Pb a 2,5 mM, diluído no meio de cultura e adicionado a cultura celular 1 hora antes das toxinas), por 24 horas. Então, o meio foi substituído por meio novo (90 μ L/poço) e 10 μ L/poço da solução de MTT (5 mg/mL) (Sigma, St. Louis, EUA). Depois de 4 horas a 37°C e 5% de CO₂, descartou-se o meio e adicionou-se 100 μ L/poço de dimetilsulfóxido (Sigma, St. Louis, EUA) a fim de dissolver os cristais de formazan. A placa permaneceu quinze minutos sob agitação e, por fim, ela foi submetida à leitura da absorbância no leitor de microplaca Bio-Rad 680 no comprimento de onda de 570 nm.

4.4 IMUNOCITOQUÍMICA PARA DETECÇÃO DO OAT1 E OAT3

A imunocoloração decorrente da presença de OAT1 e OAT3 em células RASM foi feita segundo Enomoto *et al.* (2002) e Yamamoto *et al.* (2006). Para tanto, 3×10^4 células/poço foram plaqueadas sobre lamínulas em placa de 24 poços. Quando as células atingiram 70% de confluência, elas foram tratadas com PCm e PCSm por 24 horas. Após, as células foram fixadas com paraformaldeído a 4% por 10 minutos, permeabilizadas com Triton X-100 0,1% em PBS por 5 minutos e incubadas com peróxido de hidrogênio 3% em PBS por 30 minutos para a supressão da atividade da peroxidase endógena. Na sequência, adicionou-se a solução de bloqueio de BSA 0,5% em PBS, seguida da incubação com o anticorpo primário anti-OAT1 e anti-OAT3 1:100 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, EUA) por 18 horas a 4°C. Após a lavagem com PBS, foi adicionado o anticorpo secundário marcado com peroxidase (HRP) na diluição 1:150 por 1 hora a temperatura ambiente. A marcação

foi revelada com solução de diaminobanzidina (DAB) e a contra coloração foi feita com hematoxilina de Harris diluído em água na proporção de 1:1. Finalmente, as lâminas foram analisadas com aumento de 20 vezes no microscópio de luz motorizado Axio Imager Z2 (Carl Zeiss, Jena, DE), equipado com um digitalizador automático VSlide (Metasystems, Altlussheim, DE).

4.5 ANÁLISE DE OAT1 POR *DOT-BLOT*

4.5.1 Extrato celular

Para avaliar a expressão proteica, as células RASM foram cultivadas até atingirem confluência em frascos de cultivo. Então, foram incubadas a 37°C e 5% de CO₂ por 24 horas com PCm e PCSm, com ou sem Pb. Posteriormente, com o auxílio de uma espátula as células foram soltas do frasco de cultivo em PBS gelado. Após centrifugação por 10 minutos em 300 g, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspensionado em 100 µL de tampão de lise RIPA (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM Na₂EDTA, 1 mM EGTA, 2,5 mM pirofosfato de sódio, 1mM b-glicerofosfato, 1mM Na₂PO₄, 1% de NP-40, 1% de desoxicolato de sódio e leupeptina a 1 µg/mL) com inibidores de proteases Cmini (Roche) e PhosStop (Roche). Na sequência, foram centrifugadas por 30 minutos em 14000 g a 4°C. Os sobrenadantes foram congelados e submetidos posteriormente a dosagem de proteínas totais pelo método de Bradford (1976), utilizando o kit Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, California, EUA).

4.5.2 Dot-blot

Em membranas de nitrocelulose com poros de 0,45 μm (GE, Alemanha), adicionou-se 5 μL da solução de extrato na concentração de 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de proteínas totais diluídos em tampão de lise RIPA. Posteriormente, as membranas foram incubadas com solução de bloqueio (TBS-Tween 20 0,3%) por 1 hora sob agitação a temperatura ambiente (22°C). Após essa etapa, lavou-se mais seis vezes por 5 minutos cada com solução de lavagem contendo TBS-Tween 20 0,05%, seguida de incubação por 18 horas a 4°C com anti-OAT1 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, EUA) diluído 1:1000 em solução de bloqueio. As membranas foram lavadas e incubadas com anticorpo secundário anti-goat (Sigma, St. Louis, EUA) marcado com peroxidase (HRP) na diluição 1:20000 por 1 hora sob agitação a temperatura ambiente. Depois das lavagens, as membranas foram reveladas por quimiluminescência (ECL). Os resultados foram interpretados com o auxílio do software Image Studio Lite versão 4.0.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para avaliar os resultados entre os grupos foram utilizados os testes t de Student e Mann-Whitney. Os resultados que apresentaram $P < 0,05$ foram considerados significativos. Nos gráficos, os valores foram expressos com as médias e \pm erro padrão da média (EPM). Os dados foram analisados com o software Prism 6.01 (GraphPad, San Diego, EUA).

5 RESULTADOS

5.1 VIABILIDADE CELULAR

O ensaio de MTT foi utilizado para avaliar a viabilidade celular e consiste na redução dos sais de MTT pela enzima succinato desidrogenase presente nas mitocôndrias das células com o metabolismo ativo, resultando na formação de cristais de formazan, de coloração púrpura, de modo proporcional à quantidade de células viáveis. As figuras 4 e 5 ilustram o efeito do PC e do PCS nas células musculares após 24 horas de tratamento para ambas as toxinas em três concentrações distintas (normal, urêmica e máxima urêmica). O mesmo ensaio foi realizado com a adição de Pb (inibidor de OAT1 e OAT3).

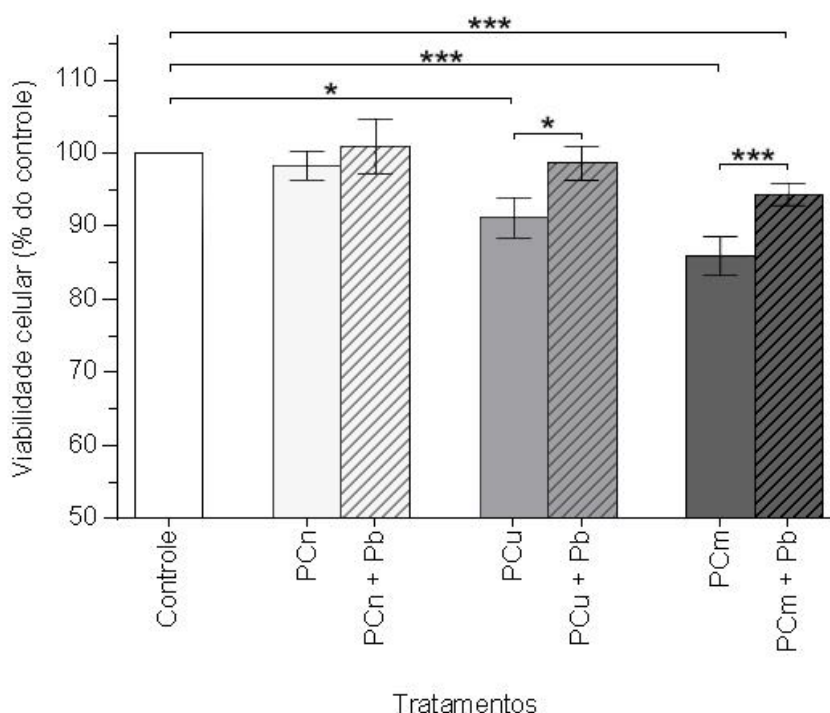


Figura 4 – Avaliação da viabilidade das células RASM após exposição ao PC. As células foram tratadas com o PC nas concentrações normal, urêmica e máxima urêmica a 37°C por 24 horas e tratadas com MTT por 4 horas. A viabilidade das células não tratadas (controle) foi considerada 100%. Os dados foram expressos como média \pm EPM de três experimentos independentes. * $P < 0,05$, *** $P < 0,0001$. PCn, concentração normal de PC; PCu, concentração urêmica de PC; PCm, concentração máxima urêmica de PC; Pb, Pb na concentração de 2,5 mM.

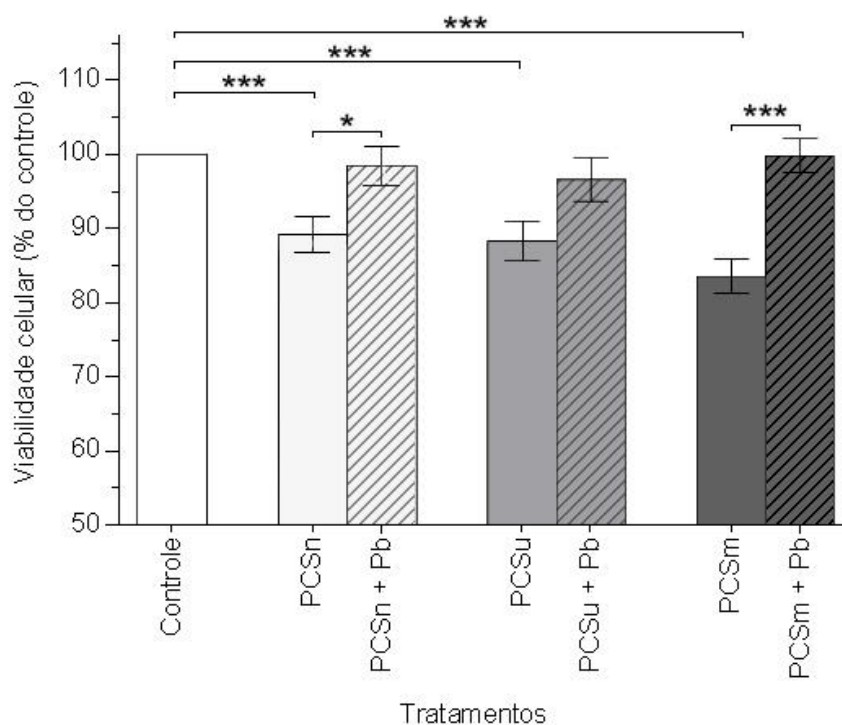


Figura 5 – Avaliação da viabilidade das células RASM após exposição ao PCS. As células RASM foram tratadas com o PCS nas concentrações normal, urêmica e máxima urêmica a 37°C por 24 horas e tratadas com MTT por 4 horas. A viabilidade das células não tratadas (controle) foi considerada 100%. Os dados foram expressos com a média \pm EPM de três experimentos independentes. * $P < 0,05$, *** $P < 0,0001$. PCSn, concentração normal de PCS; PCSu, concentração urêmica de PCS; PCSm, concentração máxima urêmica de PCS; Pb, Pb na concentração de 2,5 mM.

5.2 DETECÇÃO DE OAT1 E OAT3

Utilizou-se o método de imunocitoquímica do tipo indireto sobre as células RASM para determinar a expressão de OAT1 e de OAT3, associados à captação tanto de PC como de PCS (WATANABE; SAKAGUCHI; *et al.*, 2013). Dessa maneira, ligaram-se aos transportadores os anticorpos primários que, por conseguinte, reagiram com os anticorpos secundários. Com isso, o cromógeno DAB se precipitou na forma de polímero ante ao peróxido de hidrogênio e à peroxidase (HRP) vinculada ao anticorpo secundário, resultando na cor castanha. A coloração positiva pode ser verificada nas figuras 6 e 7 indicando a presença de OAT1 e de OAT3, respectivamente. A coloração foi específica visto que só o anticorpo secundário não foi capaz de produzir cor castanha (Figura 6A, 6B, 7A e 7B). Visualmente e comparativamente, observou-se maior expressão de OAT1 do que OAT3.

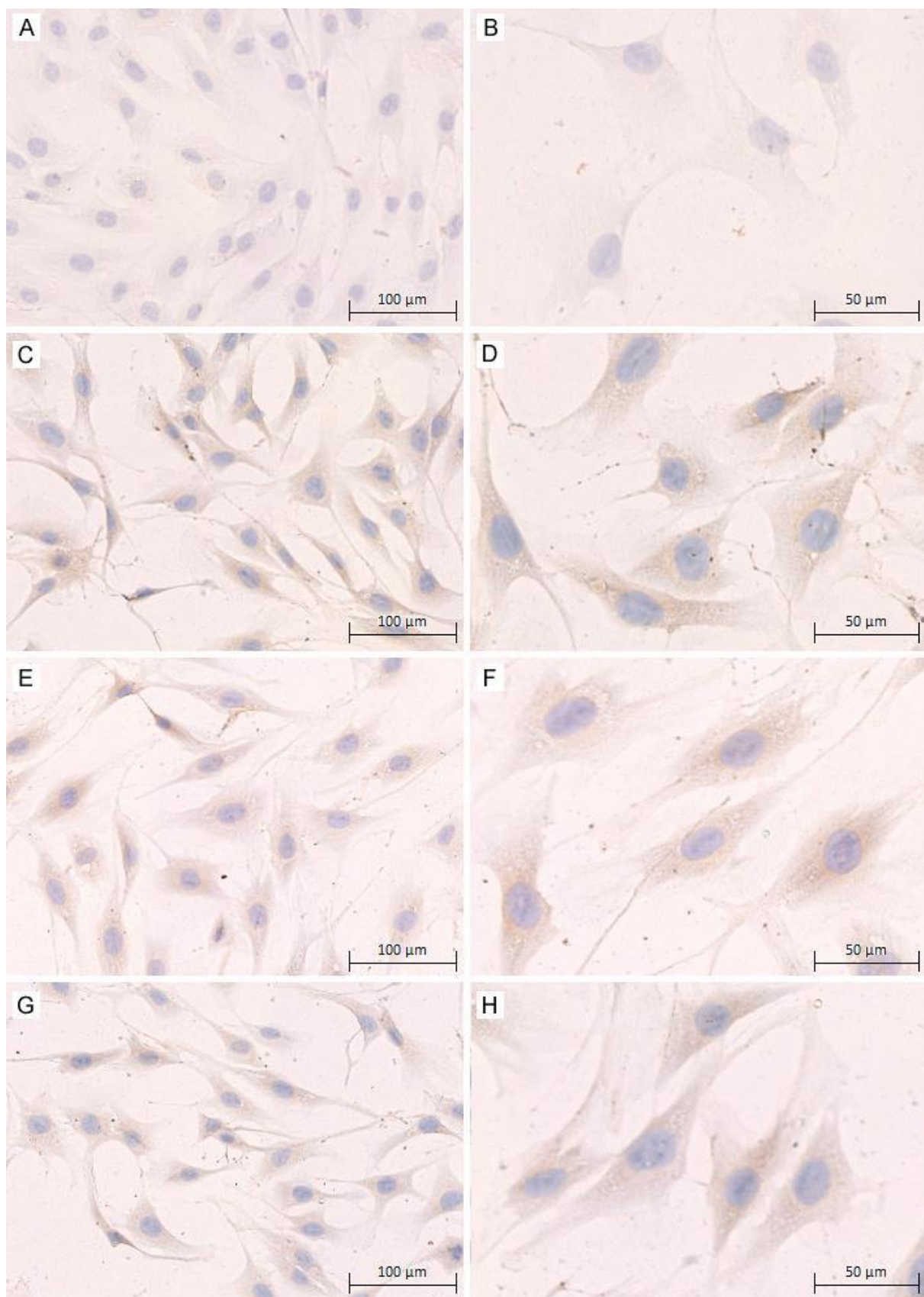


Figura 6 – Efeito do PC e do PCS na coloração por imunocitoquímica para OAT1. As células RASM foram tratadas com PC ou PCS por 24 horas a 37°C e então imunocoradas para OAT1. Controle secundário, sem anticorpo primário (A e B); controle, sem tratamento com toxinas (C e D); PCm, tratamento na concentração máxima urêmica de PC (E e F); PCSm, tratamento na concentração máxima urêmica de PCS (G e H). Aumento de 5x (A, C, E e G) e de 10x (B, D, F e H).

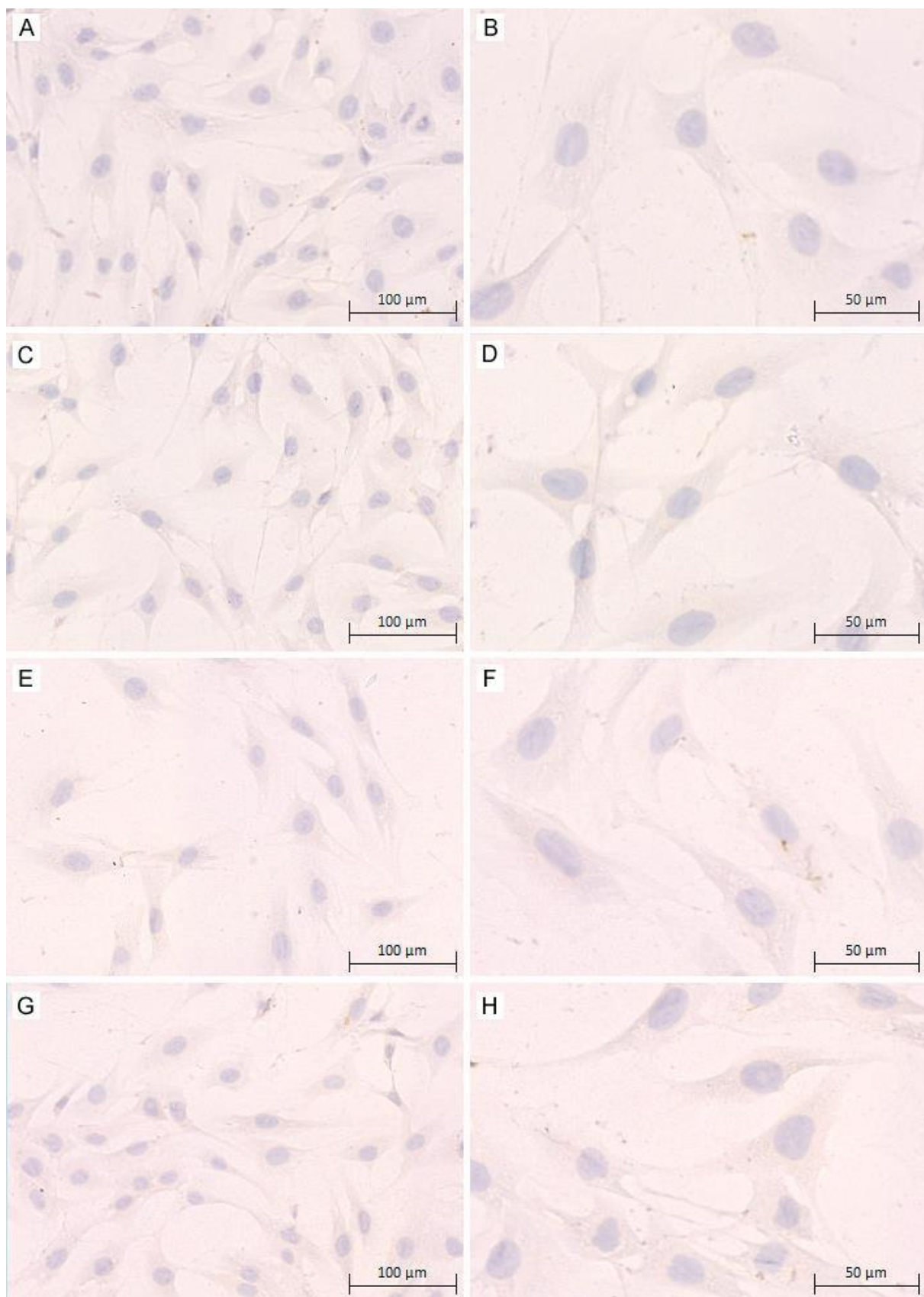


Figura 7 – Efeito do PC e do PCS na coloração por imunocitoquímica para OAT3. As células RASM foram tratadas com PC ou PCS por 24 horas a 37°C e então imunocoradas para OAT3. Controle secundário, sem anticorpo primário (A e B); controle, sem tratamento com toxinas (C e D); PCm, tratamento na concentração máxima urêmica de PC (E e F); PCSm, tratamento na concentração máxima urêmica de PCS (G e H). Aumento de 5x (A, C, E e G) e de 10x (B, D, F e H).

5.3 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE OAT1

A expressão de OAT1 foi investigada por *Dot-blot*, no qual se obteve o extrato proteico e, a partir dele, detectou-se a proteína de interesse através da especificidade do anticorpo. A quantificação de OAT1 é apresentada na figura 8. Os valores relativos representam a média \pm EPM de seis experimentos independentes. A partir desses dados, verifica-se uma expressão significativa ($P<0,01$) de OAT1 no tratamento com PC na concentração máxima urêmica.

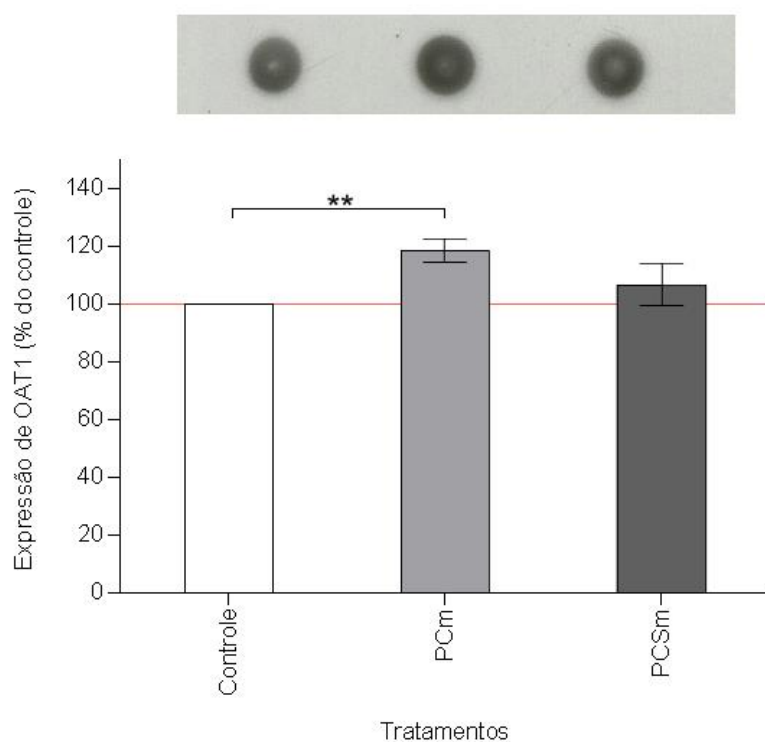


Figura 8 – Expressão de OAT1 em células RASM após tratamento com PC ou PCS na concentração máxima urêmica. ** $P<0,01$.

6 DISCUSSÃO

A toxicidade urêmica tem sido tema de investigação em diversos trabalhos nas últimas décadas em busca da elucidação de seus desdobramentos sobre os diferentes tecidos e células. Sob essa perspectiva, o presente trabalho investigou a expressão de OAT1 e OAT3 com o objetivo de correlacioná-las com a captação das toxinas urêmicas PC e PCS em células RASM.

Neste trabalho, verificou-se a presença de OAT1 e OAT3 em células RASM após tratamento com PC e PCS. Através do ensaio de viabilidade celular (MTT), foi possível identificar uma redução do número de células viáveis após 24 horas de exposição ao PC e ao PCS, especialmente nas concentrações máximas, observando-se uma relação dose-dependente para ambas as toxinas. A viabilidade celular foi restabelecida no ensaio de MTT na presença de Pb, um inibidor conhecido de OAT1 e OAT3. O mesmo efeito inibitório da toxicidade de PCS com Pb foi observado por Watanabe e Miyamoto *et al.* (2013). Desta forma, esses resultados sugerem fortemente que os OATs são os possíveis transportadores dessas toxinas.

Outros estudos também investigaram os efeitos citológicos ocasionados pelas toxinas urêmicas. Brocca *et al.* (2013) observaram que o PC provocou decréscimo na viabilidade em células do túbulo proximal dos rins. Nesse mesmo tipo celular, Watanabe *et al.* (2013) observaram o efeito deletério e dose-dependente do PCS. De forma similar, Tanaka *et al.* (2013) verificaram uma queda na viabilidade de osteoblastos em cultura expostos ao PCS com comportamento dose-dependente. Estes autores ainda demonstraram o aumento da fragmentação do DNA com o aumento da concentração de PCS. No entanto, a exposição às toxinas urêmicas não necessariamente leva a morte celular. Em VSMCs extraídas de veias do cordão umbilical humano, Maciel *et al.* (2013) (dados não publicados) não encontraram diferença significativa entre os tratamentos de PC e PCS quando comparados ao controle. Schepers *et al.* (2007) também não verificaram alterações significativas na viabilidade de leucócitos tratados com essas mesmas toxinas. Todavia, outros efeitos podem ser observados, tais como os encontrados por Yamamoto *et al.* (2006). Estes autores demonstraram que o indoxil sulfato, outra conhecida toxina urêmica ligada à proteína, promoveu a proliferação celular das VSMCs de rato. De

acordo com Muteliefu *et al.* (2009), o indoxil sulfato ainda induz em células vasculares de músculo liso humano a expressão de proteínas específicas de osteoblastos, como a osteopontina.

Através da imunocitoquímica foi observada uma maior expressão de OAT1 em comparação com o OAT3. Em relação à diferença na expressão de transportadores, Hilgendorf *et al.* (2007) analisaram essa especificidade em vários tecidos humanos através da quantificação do RNA mensageiro. Nos rins, os autores encontraram uma alta expressão de OAT1 seguida do OAT3, o equivalente a, respectivamente, cinco e três vezes mais do que o próximo transportador com maior expressão, o OAT4. Todavia, Adijiang *et al.* (2008) observaram a expressão mais proeminente de OAT3 do que OAT1 em células vasculares de músculo da aorta de ratos. Yamamoto *et al.* (2006) também constataram, por imunocitoquímica, que as VSMCs de ratos expressam OAT3.

Entretanto, não foram observadas diferenças concludentes entre os tratamentos e o controle pela imunocitoquímica. Assim sendo, foi realizada a técnica de *Dot-blot* para detecção de OAT1, o transportador mais expresso. Desta forma, observou-se um aumento na expressão de OAT1 no tratamento com PCm em relação ao controle. De fato, diversas patologias podem alterar a expressão dos OATs (ANZAI *et al.*, 2006). Enomoto *et al.* (2002) demonstraram por imunohistoquímica o aumento da expressão de OAT1 e OAT3 nos túbulos renais em ratos nefrectomizados tratados com o indoxil sulfato por 10 semanas. Naud *et al.* (2011) identificaram por *Western blot* um decréscimo de OAT1 e OAT3 nos rins de ratos após 42 dias da nefrectomia.

Uma vez dentro das células, as toxinas urêmicas perturbam e alteram os mecanismos celulares. Watanabe *et al.* (2013) demonstraram em células epiteliais do túbulo proximal humano que a acumulação intracelular de PCS está associada ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio por meio da técnica de marcação por fluorescência. Além disso, esses autores verificaram o restabelecimento da viabilidade celular na presença do antioxidante N-acetil-L-cisteína (NAC), correlacionando a citotoxicidade de PCS com o estresse oxidativo. Os autores ainda observaram que o PCS também está relacionado com o aumento da expressão da NADPH oxidase através da quantificação do RNA mensageiro de duas subunidades da proteína, a p22^{phox} e a Nox4. Sun *et al.* (2012) estudaram em

cultura de células do túbulo renal humano a inibição da expressão do gene Klotho, apontado como supressor de tumor, por PCS e indoxil sulfato, provavelmente em razão da hipermetilação do gene.

Considerando tais efeitos decorrentes do PC e do PCS em condições urêmicas e a expressão de OATs nas células RASM, estudos futuros poderão explorar mecanismos celulares e moleculares, principalmente aqueles envolvidos com o processo inflamatório. Em resumo, o estudo da ação de toxinas urêmicas, abrangendo desde a sua captação, é imprescindível para compreender a relação existente entre a DRC e as complicações no sistema cardiovascular, além de outras comorbidades. Valendo-se disso, as descobertas nesta área podem contribuir na pesquisa de novos alvos terapêuticos e, dessa forma, aumentar a sobrevida dos pacientes com DRC.

7 CONCLUSÃO

- ✓ As células RASM tiveram sua viabilidade reduzida quando expostas ao PC e PCS em concentrações urêmicas e máxima urêmicas;
- ✓ Com o Pb, um inibidor de OATs, a viabilidade celular foi restabelecida nos tratamentos com PC e PCS;
- ✓ Observou-se maior expressão de OAT1 do que OAT3 pela imunocitoquímica, porém não foram identificadas diferenças concludentes entre o controle e os tratamentos;
- ✓ Através da técnica de *Dot-blot*, verificou-se aumento na expressão de OAT1 após o tratamento com PCm em relação ao controle.

8 ENSAIOS FUTUROS

- ✓ Realização de *Western Blot* para detecção de OAT1 e OAT3;
- ✓ Ensaios de sinalização celular a fim de avaliar vias ativadas e suprimidas pelas toxinas urêmicas.

REFERÊNCIAS

ADIJIANG, A.; GOTO, S.; URAMOTO, S.; NISHIJIMA, F.; NIWA, T. Indoxyl sulphate promotes aortic calcification with expression of osteoblast-specific proteins in hypertensive rats. **Nephrology, Dialysis, Transplantation**, v. 23, n. 6, p. 1892–901, 2008.

ALEBOUYEH, M.; TAKEDA, M.; ONOZATO, M. L.; TOJO, A.; NOSHIRO, R. Expression of Human Organic Anion Transporters in the Choroid Plexus and Their Interactions With Neurotransmitter Metabolites. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 93, p. 430–436, 2003.

ANZAI, N.; KANAI, Y.; ENDOU, H. Organic Anion Transporter Family: Current Knowledge. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 100, p. 411–426, 2006.

ASIF, A. R.; STEFFGEN, J.; METTEN, M.; *et al.* Presence of organic anion transporters 3 (OAT3) and 4 (OAT4) in human adrenocortical cells. **Pflügers Archiv European Journal of Physiology**, v. 450, n. 2, p. 88–95, 2005.

BARRETO, F. C.; STINGHEN, A. E. M.; OLIVEIRA, R. B. DE; *et al.* The quest for a better understanding of chronic kidney disease complications: an update on uremic toxins. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 36, n. 2, p. 221–235, 2014.

BARROS, S. A; SRIMAROENG, C.; PERRY, J. L.; *et al.* Activation of protein kinase Czeta increases OAT1 (SLC22A6)- and OAT3 (SLC22A8)-mediated transport. **The Journal of biological chemistry**, v. 284, n. 5, p. 2672–9, 2009.

BASTOS, M. G.; KIRSZTAJN, G. M. Doença renal crônica: importância do diagnóstico precoce. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 33, n. 1, p. 93–108, 2011.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248–254, 1976.

BRO, S.; MOELLER, F.; ANDERSEN, C. B.; OLGAARD, K.; NIELSEN, L. B. Increased Expression of Adhesion Molecules in Uremic Atherosclerosis in Apolipoprotein-E-Deficient Mice. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 15, n. 6, p. 1495–1503, 2004.

BROCCA, A.; VIRZÌ, G. M.; CAL, M. DE; CANTALUPPI, V.; RONCO, C. Cytotoxic effects of p-cresol in renal epithelial tubular cells. **Blood purification**, v. 36, n. 3-4, p. 219–225, 2013.

BULACIO, R.; HAZELHOFF, M. H.; TORRES, A. M. Renal expression and function of oat1 and oat3 in rats with vascular calcification. **Pharmacology**, v. 90, n. 1-2, p. 66–77, 2012.

BUONASSISI, V.; VENTER, J. C. Hormone and neurotransmitter receptors in an established vascular endothelial cell line. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 73, n. 5, p. 1612–1616, 1976.

BURCKHARDT, G. Pharmacology & Therapeutics Drug transport by Organic Anion Transporters (OATs). **Pharmacology and Therapeutics**, v. 136, n. 1, p. 106–130, 2012.

BURCKHARDT, G.; WOLFF, N. A. Structure of renal organic anion and cation transporters. **American Journal of Physiology**, v. 278, n. 6, p. F853–866, 2000.

CAFARO, V.; NOTOMISTA, E.; CAPASSO, P.; DONATO, A. DI. Mutation of glutamic acid 103 of toluene o-xylene monooxygenase as a means to control the catabolic efficiency of a recombinant upper pathway for degradation of methylated aromatic compounds. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 8, p. 4744–4750, 2005.

CENSO SBN. Sociedade Brasileira de Nefrologia, 2013. Disponível em: <http://sbn.org.br/pdf/censo_2013_publico_leigo.pdf>. Acesso em: 10/10/2014.

CHITALIA, V. C.; SHIVANNA, S.; MARTORELL, J.; *et al.* Uremic serum and solutes increase post-vascular interventional thrombotic risk through altered stability of smooth muscle cell tissue factor. **Circulation**, v. 127, n. 3, p. 365–76, 2013.

COHEN, G.; GLORIEUX, G.; THORNALLEY, P.; *et al.* Review on uraemic toxins III: recommendations for handling uraemic retention solutes in vitro--towards a standardized approach for research on uraemia. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 22, n. 12, p. 3381–3390, 2007.

DORAN, A. C.; MELLER, N.; MCNAMARA, C. A. Progression of Atherosclerosis. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 28, n. 5, p. 812–819, 2008.

DURANTON, F.; COHEN, G.; SMET, R. DE; *et al.* Normal and pathologic concentrations of uremic toxins. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 23, n. 7, p. 1258–70, 2012.

EL NAHAS, M. Cardio-kidney-damage: a unifying concept. **Kidney International**, v. 78, n. 1, p. 14–18, 2010.

ENOMOTO, A.; TAKEDA, M.; TOJO, A.; *et al.* Role of Organic Anion Transporters in the Tubular Transport of Indoxyl Sulfate and the Induction of its Nephrotoxicity. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 13, n. 7, p. 1711–1720, 2002.

EVANS, P. D.; TAAL, M. W. Epidemiology and causes of chronic kidney disease. **Medicine**, v. 39, n. 7, p. 402–406, 2011.

FENG, B.; ZHANG, Y.; MU, J.; *et al.* Preventive effect of a proteasome inhibitor on the formation of accelerated atherosclerosis in rabbits with uremia. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 55, n. 2, p. 129–38, 2010.

GENOVESE, G.; FRIEDMAN, D. J.; ROSS, M. D.; *et al.* Association of Trypanolytic ApoL1 Variants with Kidney Disease in African-Americans. **Science**, v. 329, n. 5993, p. 841–845, 2010.

GO, A. S.; CHERTOW, G. M.; FAN, D.; MCCULLOCH, C. E.; HSU, C. Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. **The New England Journal of Medicine**, v. 351, n. 13, p. 1296–1305, 2004.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. 12^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

HAUSER, A. B.; AZEVEDO, I. R. F.; GONÇALVES, S.; *et al.* Sevelamer carbonate reduces inflammation and endotoxemia in an animal model of uremia. **Blood purification**, v. 30, n. 3, p. 153–8, 2010.

HILGENDORF, C.; AHLIN, G.; SEITHEL, A.; *et al.* Expression of Thirty-six Drug Transporter Genes in Human Intestine , Liver , Kidney , and Organotypic Cell Lines. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 35, n. 8, p. 1333–1340, 2007.

JHA, V.; GARCIA-GARCIA, G.; ISEKI, K.; *et al.* Chronic kidney disease: global dimension and perspectives. **Lancet**, v. 382, n. 9888, p. 260–72, 2013.

JI, L.; MASUDA, S.; SAITO, H.; INUI, K.-I. Down-regulation of rat organic cation transporter rOCT2 by 5/6 nephrectomy. **Kidney International**, v. 62, p. 514–524, 2002.

JIN, L.; KIKUCHI, R.; SAJI, T.; KUSUHARA, H.; SUGIYAMA, Y. Regulation of tissue-specific expression of renal organic anion transporters by hepatocyte nuclear factor 1 α/β and DNA methylation. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 340, n. 3, p. 2091–2097, 2012.

KANJI, Z.; POWE, C. E.; WENGER, J. B.; *et al.* Genetic variation in APOL1 associates with younger age at hemodialysis initiation. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 22, n. 11, p. 2091–2097, 2011.

KATO, S.; CHMIELEWSKI, M.; HONDA, H.; *et al.* Aspects of Immune Dysfunction in End-stage Renal Disease. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 3, n. 5, p. 1526–1533, 2008.

KIKUCHI, R.; KUSUHARA, H.; HATTORI, N.; *et al.* Regulation of the expression of human organic anion transporter 3 by hepatocyte nuclear factor 1 α /beta and DNA methylation. **Molecular pharmacology**, v. 70, n. 3, p. 887–896, 2006.

KOEPSELL, H. The SLC22 family with transporters of organic cations, anions and zwitterions. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 34, n. 2-3, p. 413–35, 2013.

LI, A. C.; GLASS, C. K. The macrophage foam cell as a target. **Nature Medicine**, v. 8, n. 11, p. 1235–1242, 2002.

LIABEUF, S.; GLORIEUX, G.; LENGLET, A.; *et al.* Does p-cresylglucuronide have the same impact on mortality as other protein-bound uremic toxins? **PloS one**, v. 8, n. 6, p. e67168, 2013.

LIU, J.; MA, K. L.; GAO, M.; *et al.* Inflammation disrupts the LDL receptor pathway and accelerates the progression of vascular calcification in ESRD patients. **PloS one**, v. 7, n. 10, p. e47217, 2012.

LOOR, H. DE; BAMMENS, B.; EVENEPOEL, P.; PRETER, V. DE; VERBEKE, K. Gas Chromatographic–Mass Spectrometric Analysis for Measurement of p-Cresol and Its Conjugated Metabolites in Uremic and Normal Serum. **Clinical Chemistry**, v. 51, n. 8, p. 1533–1535, 2005.

LOZANO, R.; NAGHAVI, M.; FOREMAN, K.; *et al.* Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. **Lancet**, v. 380, n. 9859, p. 2095–2128, 2012.

LU, R.; CHAN, B. S.; SCHUSTER, V. L. Cloning of the human kidney PAH transporter: narrow substrate specificity and regulation by protein kinase C. **American Journal of Physiology**, v. 1, n. 31, p. 295–303, 1999.

MACIEL, R. A. P. **Avaliação da toxicidade urêmica de p-cresol e p-cresilsulfato na expressão de MCP-1 via NF- κ B em células musculares lisas humanas (VSMC)**. Trabalho de Dissertação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia — Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

MAHER, J. M.; SLITT, A. L.; CALLAGHAN, T. N.; *et al.* Alterations in transporter expression in liver, kidney, and duodenum after targeted disruption of the transcription factor HNF1alpha. **Biochemical pharmacology**, v. 72, n. 4, p. 512–22, 2006.

MEIJERS, B. K. I.; EVENEPOEL, P. The gut-kidney axis: indoxyl sulfate, p-cresyl sulfate and CKD progression. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 26, n. 3, p. 759–761, 2011.

MEIJERS, B. K. I.; KERCKHOVEN, S. VAN; VERBEKE, K.; *et al.* The uremic retention solute p-cresyl sulfate and markers of endothelial damage. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 54, n. 5, p. 891–901, 2009.

MIYAMOTO, Y.; WATANABE, H.; NOGUCHI, T.; *et al.* Organic anion transporters play an important role in the uptake of p-cresyl sulfate, a uremic toxin, in the kidney. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 26, n. 8, p. 2498–2502, 2011.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55–63, 1983.

MUTELIEFU, G.; ENOMOTO, A.; JIANG, P.; TAKAHASHI, M.; NIWA, T. Indoxyl sulphate induces oxidative stress and the expression of osteoblast-specific proteins in vascular smooth muscle cells. **Nephrology, Dialysis, Transplantation**, v. 24, n. 7, p. 2051–8, 2009.

NAUD, J.; ROGER, M.; LEBLOND, F. A.; PICHETTE, V. Effects of Chronic Renal Failure on Kidney Drug Transporters and Cytochrome P450 in Rats. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 39, n. 8, p. 1363–1369, 2011.

NISHIMURA, M.; NAITO, S. Tissue-specific mRNA Expression Profiles of Human ATP-binding Cassette and Solute Carrier Transporter Superfamilies. **Drug Metab. Pharmacokinet**, v. 20, n. 6, p. 452–477, 2005.

NKF. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 39, p. 327, 2002.

ODA, A.; TANIGUCHI, T.; YOKOYAMA, M. Leptin Stimulates Rat Aortic Smooth Muscle Cell Proliferation and Migration. **Kobe Journal of Medical Sciences**, v. 47, n. June, p. 141–150, 2001.

OLIVEIRA, R. B. DE; OKAZAKI, H.; STINGHEN, A. E. M.; *et al.* Vascular calcification in chronic kidney disease: a review. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 35, n. 2, p. 147–161, 2013.

PERSICO, A. M.; NAPOLIONI, V. Urinary p-cresol in autism spectrum disorder. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 36, n. 2012, p. 82–90, 2012. Elsevier Inc.

POESEN, R.; VIAENE, L.; VERBEKE, K.; *et al.* Renal clearance and intestinal generation of p-cresyl sulfate and indoxyl sulfate in CKD. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 8, n. 9, p. 1508–1514, 2013.

PRITCHARD, J. B.; SWEET, D. H.; MILLER, D. S.; WALDEN, R. Mechanism of Organic Anion Transport across the Apical Membrane of Choroid Plexus. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 47, p. 33382–33387, 1999.

ROSSI, M.; CAMPBELL, K. L.; JOHNSON, D. W.; *et al.* Protein-bound uremic toxins, inflammation and oxidative stress: a cross-sectional study in stage 3-4 chronic kidney disease. **Archives of Medical Research**, v. 45, n. 4, p. 309–317, 2014.

SAITO, H. Pathophysiological regulation of renal SLC22A organic ion transporters in acute kidney injury: pharmacological and toxicological implications. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 125, n. 1, p. 79–91, 2010.

SCHEPERS, E.; MEERT, N.; GLORIEUX, G.; *et al.* P-cresylsulphate, the main in vivo metabolite of p-cresol, activates leucocyte free radical production. **Nephrology, Dialysis, Transplantation**, v. 22, n. 2, p. 592–6, 2007.

SELMER, T.; ANDREI, P. I. p-Hydroxyphenylacetate decarboxylase from *Clostridium difficile*. A novel glycyl radical enzyme catalysing the formation of p-cresol. **European Journal of Biochemistry**, v. 268, n. 5, p. 1363–1372, 2001.

SESSO, R. C.; LOPES, A. A.; THOMÉ, F. S.; *et al.* Report of the Brazilian Chronic Dialysis Census 2012. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 36, n. 1, p. 48–53, 2014.

SESSO, R. DE C. C.; LOPES, A. A.; THOMÉ, F. S.; LUGON, J. R.; BURDMANN, E. A. Censo Brasileiro de Diálise, 2009. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 32, p. 380–384, 2010.

STINGHEN, A. E. M.; GONÇALVES, S. M.; MARTINES, E. G.; *et al.* Increased plasma and endothelial cell expression of chemokines and adhesion molecules in chronic kidney disease. **Nephron. Clinical Practice**, v. 111, n. 2, p. c117–c126, 2009.

STINGHEN, A. E. M.; BUCHARLES, S.; RIELLA, M. C.; PECOITS-FILHO, R. Immune Mechanisms Involved in Cardiovascular Complications of Chronic Kidney Disease. **Blood Purification**, v. 29, n. 2, p. 114–120, 2010.

STINGHEN, A. E. M.; PECOITS-FILHO, R. Vascular damage in kidney disease: beyond hypertension. **International Journal of Hypertension**, v. 2011, p. 5, 2011.

SUN, C.-Y.; CHANG, S.-C.; WU, M.-S. Uremic toxins induce kidney fibrosis by activating intrarenal renin-angiotensin-aldosterone system associated epithelial-to-mesenchymal transition. **PloS one**, v. 7, n. 3, p. e34026, 2012.

TANAKA, H.; IWASAKI, Y.; YAMATO, H.; *et al.* p-Cresyl sulfate induces osteoblast dysfunction through activating JNK and p38 MAPK pathways. **Bone**, v. 56, n. 2, p. 347–54, 2013.

TANAKA, K.; XU, W.; ZHOU, F.; YOU, G. Role of glycosylation in the organic anion transporter OAT1. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 15, p. 14961–14966, 2004.

TORRES, A. M.; LAUGHLIN, M. MAC; MULLER, A.; *et al.* Altered renal elimination of organic anions in rats with chronic renal failure. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1740, p. 29–37, 2005.

ULLRICH, K. J. Renal Transporters for Organic Anions and Organic Cations. Structural Requirements for Substrates. **The Journal of Membrane Biology**, v. 158, p. 95–107, 1997.

VANHOLDER, R.; BAMMENS, B.; LOOR, H. DE; *et al.* Warning: the unfortunate end of p-cresol as a uraemic toxin. **Nephrology, Dialysis, Transplantation**, v. 26, n. 5, p. 1464–1467, 2011.

VANHOLDER, R.; LAECKE, S. VAN; GLORIEUX, G. What is new in uremic toxicity? **Pediatric Nephrology**, v. 23, n. 8, p. 1211–1221, 2008.

VANHOLDER, R.; MASSY, Z.; ARGILES, A.; *et al.* Chronic kidney disease as cause of cardiovascular morbidity and mortality. **Nephrology, Dialysis, Transplantation**, v. 20, n. 6, p. 1048–56, 2005.

VANHOLDER, R.; SCHEPERS, E.; PLETINCK, A.; NAGLER, E. V; GLORIEUX, G. The Uremic Toxicity of Indoxyl Sulfate and p-Cresyl Sulfate: A Systematic Review. **Journal of the American Society of Nephrology**, p. 1–11, 2014.

VANHOLDER, R.; SMET, R. DE; LESAFFER, G. P-Cresol: a Toxin Revealing Many Neglected But Relevant Aspects of Uraemic Toxicity. **Nephrology, Dialysis, Transplantation**, v. 14, n. 12, p. 2813–5, 1999.

VANHOLDER, R.; SMET, R.; GLORIEUX, G.; *et al.* Review on uremic toxins: Classification, concentration, and interindividual variability. **Kidney International**, v. 63, p. 1934–1943, 2003.

VANWERT, A. L.; GIONFRIDDO, M. R.; SWEET, D. H. Organic Anion Transporters: Discovery, Pharmacology, Regulation and Roles in Pathophysiology. **Biopharmaceutics & Drug Disposition**, v. 31, p. 1–71, 2010.

VAZIRI, N. D.; YUAN, J.; RAHIMI, A.; *et al.* Disintegration of colonic epithelial tight junction in uremia: a likely cause of CKD-associated inflammation. **Nephrology, Dialysis, Transplantation**, v. 27, n. 7, p. 2686–2693, 2012.

WATANABE, H.; MIYAMOTO, Y.; HONDA, D.; *et al.* p-Cresyl sulfate causes renal tubular cell damage by inducing oxidative stress by activation of NADPH oxidase. **Kidney international**, v. 83, n. 4, p. 582–592, 2013. Nature Publishing Group.

WATANABE, H.; SAKAGUCHI, Y.; SUGIMOTO, R. Human organic anion transporters function as a high-capacity transporter for p -cresyl sulfate , a uremic toxin. **Clin Exp Nephrol**, 2013.

WHITED, G. M.; GIBSON, D. T. Toluene-4-monooxygenase, a three-component enzyme system that catalyzes the oxidation of toluene to p-cresol in *Pseudomonas mendocina* KR1. **Journal of Bacteriology**, v. 173, n. 9, p. 3010–6, 1991.

WOLFF, N. A.; THIES, K.; KUHNKE, N.; *et al.* Protein Kinase C Activation Downregulates Human Organic Anion Transporter 1-Mediated Transport through Carrier Internalization. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 14, n. 8, p. 1959–1968, 2003.

WOLMAN, A. T.; GIONFRIDDO, M. R.; HEINDEL, G. A; *et al.* Organic anion transporter 3 interacts selectively with lipophilic β -lactam antibiotics. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 41, n. 4, p. 791–800, 2013.

WU, I.-W.; HSU, K.-H.; LEE, C.-C.; *et al.* p-Cresyl sulphate and indoxyl sulphate predict progression of chronic kidney disease. **Nephrology, Dialysis, Transplantation**, v. 26, n. 3, p. 938–947, 2011.

YAMAMOTO, H.; TSURUOKA, S.; IOKA, T.; *et al.* Indoxyl sulfate stimulates proliferation of rat vascular smooth muscle cells. **Kidney international**, v. 69, n. 10, p. 1780–1785, 2006.

ZHANG, T.; XIANG, C. D.; GALE, D.; *et al.* Drug Transporter and Cytochrome P450 mRNA Expression in Human Ocular Barriers: Implications for Ocular Drug Disposition. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 36, n. 7, p. 1300–1307, 2008.

